

腾冲嗜热厌氧菌耐热解旋酶Tte-uvrD的克隆表达及粗酶的初步应用

章丽¹,余以刚¹,黄秀丽²,肖性龙^{1,*}

(1.华南理工大学轻工与食品学院,广东广州 510640;

2.广东省惠州市质量计量监督检测所,广东惠州 516000)

摘要:以腾冲嗜热厌氧菌(*Thermoanaerobacter tengcongensis*)基因组DNA为模版,通过PCR克隆编码解旋酶Tte-uvrD的基因 $tte-uvrD$,将该基因插入原核表达载体pET-32a(+),构建重组表达载体pET-32a(+)- $tte-uvrD$,转入*E.coli* BL21中,经蓝白斑筛选和双酶切法筛选阳性重组转化子,挑取测序正确的单个阳性菌落,在IPTG诱导下表达出重组蛋白Tte-uvrD。诱导后的菌体经超声破碎和离心,上清液用硫酸铵沉淀法初步纯化,透析除盐,冻干复溶后得到粗酶液。用tHDA反应来验证Tte-uvrD粗酶液的活性,比较不同储存温度下粗酶液酶活保持的时间,并比较-20℃下储存两个月的粗酶液与商品化纯酶的tHDA反应灵敏度。结果表明,用本研究建立的克隆方法可成功克隆出耐热解旋酶Tte-uvrD,其粗酶液能用于tHDA反应,说明粗酶液具有解旋活性;粗酶液在-20℃下第80d酶活仍能保持稳定,4℃下则只能保持酶活约一周;-20℃下储存两个月的粗酶液能达到与商品化纯酶相当的灵敏度。

关键词:腾冲嗜热厌氧菌,Tte-uvrD,克隆表达,粗酶,tHDA

Clone of Tte-uvrD from *Thermoanaerobacter tengcongensis* and activity of crude enzyme

ZHANG Li¹, YU Yi-gang¹, HUANG Xiu-li², XIAO Xing-long^{1,*}

(1.College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China;

2.Huizhou Quality and Measuring Supervision Testing Institute, Huizhou 516000, China)

Abstract: In order to obtain the crude Tte-uvrD helicase, gene $tte-uvrD$ was amplified from *Thermoanaerobacter tengcongensis* by PCR, and was cloned into prokaryotic expression vector pET-32a(+). Apart from screening by the X-Gal method and double restriction enzyme digestion method, a two-direction sequencing was performed. The recombinant vectors pET-32a(+)- $tte-uvrD$ was transformed to *E. coli* BL21 strains and were induced by IPTG. The crude enzyme of Tte-uvrD was obtained by ultrasonication, centrifugation, sedimentation of saturation ammonium sulfate, dialysis and freeze-drying. The tHDA reactions were conducted to verify the activity of crude enzyme, as well as to compare the activity between crude enzyme and commercial pure enzyme. Activities of crude enzyme in different storage temperatures were also compared. The results showed that $tte-uvrD$ gene was successfully cloned and Tte-uvrD helicase was expressed. The crude enzyme displayed a good activity in the tHDA assay, indicating that the helicase had the unwinding activity and the activity stays stable for about 80d in -20℃, but only about one week in 4℃. The crude enzyme displayed a similar sensitivity as the commercial pure enzyme after stored in -20℃ for 80d.

Key words: *Thermoanaerobacter tengcongensis*; Tte-uvrD; clone; crude enzyme; tHDA

中图分类号:TS207.4

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2014)12-0226-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2014.12.041

收稿日期:2013-08-29 * 通讯联系人

作者简介:章丽(1988-),女,在读硕士研究生,研究方向:微生物检测。

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(31101279);教育部高等学校博士学科点专项科研基金新教师类资助课题(20110172120034);广东省科技计划资助项目(2011B020314004);华南理工大学中央高校基本科研业务费重点项目(2013ZZ068);惠州市科技计划项目(0031939140712048)。

依赖解旋酶的恒温基因扩增(helicase-dependent isothermal DNA amplification, HDA)是美国 New England Biolabs 的研究人员模拟动物体内DNA的复制机制发明的一种新的体外恒温基因扩增技术^[1], HDA模拟自然界生物体内DNA复制的自然过程,由解旋酶UvrD解开双链DNA,在MutL的辅助下,依靠单链DNA结合蛋白SSB与模板单链结合,使模板单链处于单链状态并保护它的完整性,然后由DNA聚合酶催化合成互补链,双链DNA产物作为底物进入下一

轮扩增。而建立在此基础上的tHDA (thermophilic HDA) 则利用耐热解旋酶Tte-uvrD代替UvrD从而达到不用SSB和MutL即可完成核酸等温扩增的目的,目前tHDA已经应用于一些病原菌的检测^[2-4],而该方法的关键在于耐热解旋酶Tte-uvrD。目前国内尚未有关于如何制备Tte-uvrD的报道,美国Biohelix研发的Tte-uvrD克隆表达纯化方法可得到纯度及活性都较高的纯酶^[5],并且已经开发成为商品化试剂盒,但由于商品化纯Tte-uvrD酶的价格昂贵,限制了在实际检测中的应用;而纯酶的克隆表达纯化方法又十分繁琐且成本高。本研究以腾冲嗜热厌氧菌基因组为模版克隆表达出Tte-uvrD蛋白,提取粗酶液并对其进行反应活性测定,对tHDA方法的发展有重大意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

pET-32a(+) Vectors、*E.coli* BL21 (DE3)、含副溶血性弧菌目的扩增片段的标准重组质粒PMD18-tox R和相应的引物Primer 3和Primer 4 为笔者所在实验室保藏;腾冲嗜热厌氧菌基因组DNA 由中国科学院微生物研究所提供;PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase、限制性内切酶BamH I 和Xho I、T4 DNA Ligase、DL2000[™] DNA Marker、TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.3.0 TaKaRa公司;商品化纯酶Tte-uvrD (20 μ g, 0.5mg/mL) Biohelix公司;琼脂糖、Gold View、LB培养基 广州翔科仪器科技有限公司;IPTG (异丙基硫代- β -D-半乳糖苷)、X-Gal、氨苄青霉素、Evagreen、牛血清蛋白(BSA)、Bst Polymerase、dNTP 生工生物工程(上海)有限公司;其他常用试剂 均为分析纯。

TC-25/H基因扩增仪 杭州博日科技有限公司;DYY-6C电泳仪 北京市六一仪器厂;7500 Real Time PCR System (带HRM模块) 美国Applied Biosystems公司;低温微量超速离心机Centrifuge 5804 R 德国Eppendorf公司;Milli-Q超纯水系统 美国Millipore Corp公司;Spectrumlab 752s紫外可见分光光度计 上海棱光技术有限公司;SCIENTZ-II D超声波细胞粉碎机 上海乔跃电子有限公司;pH检测计PHS-3C 上海雷磁创益仪器仪表有限公司;NSKY-211B恒温培养振荡器 上海苏坤实业有限公司;LRH-250A-II生化培养箱 韶关市泰宏医疗器械有限公司;WD-9403B紫外仪 北京市六一仪器厂;ULT 1386-3-V41超低温冰箱 美国ThermoFisher Scientific公司;HH-2数显恒温水浴锅 金坛市富华仪器有限公司。

1.2 引物设计与合成

本研究根据美国国家生物信息中心(NCBI)上已公布的*Thermoanaerobacter tengcongensis*的Tte-uvrD基因序列(Gene Bank Reference Sequence: NC_003869.1),采用Primer Premier 5.0引物设计软件,并利用NCBI网站上的BLAST进行序列比较和同源性分析,自主设计一对特异性扩增引物如下:上游引物Primer 1: PTYNde pf 5'-ATAGGATCCATGATTGGAGTGAAAA

AGATGAA-3' (包含一个BamH I 酶切位点);下游引物Primer 2: TCUVRDPR 5'-AAACTCGAGTTAAGAA ATTGCCTTAATAGGAG-3' (包含一个Xho I 酶切位点)。预计扩增片段大小为2142bp,引物由TaKaRa公司合成。

1.3 Tte-uvrD的克隆及序列分析

以腾冲嗜热厌氧菌基因组DNA为PCR扩增的模版,反应体系(50 μ L)为:5 \times PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ plus) 10 μ L, dNTP Mixture (各2.5mmol/L) 4 μ L, Primer 1 (10 μ mol/L) 1 μ L, Primer 2 (10 μ mol/L) 1 μ L, 模版DNA 1 μ L (<200ng), PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase (2.5U/ μ L) 0.5 μ L, 灭菌重蒸水32.5 μ L, 混匀。PCR反应条件:98 $^{\circ}$ C预变性10s, 98 $^{\circ}$ C变性10s, 55 $^{\circ}$ C退火5s, 72 $^{\circ}$ C延伸2min, 进行30个循环, 72 $^{\circ}$ C延伸10min。取PCR产物1 μ L进行1%琼脂糖凝胶电泳,用Gold view染色后进行紫外检测,得到的目的条带(约2kbp)。用TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.3.0对50 μ L PCR反应液进行切胶回收。

1.4 Tte-UvrD的克隆表达

目的基因片段tte-uvrD和载体pET-32a(+) 的双酶切均用限制性内切酶Xho I 和BamH I 双酶切。酶切体系(20 μ L)为:目的基因片段或质粒10 μ L, 10 \times K Buffer 2 μ L, BamH I 1 μ L, Xho I 1 μ L, ddH₂O补齐至20 μ L; 37 $^{\circ}$ C下酶切1h。酶解液进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。用1.3中方法进行切胶回收DNA。回收目的基因片段后,以T4 DNA连接酶进行连接,载体与目的基因片段的摩尔数之比为1:10,连接体系(25 μ L)为:10 \times T4 DNA Ligase Buffer 2.5 μ L, DNA片段10 μ L, 载体DNA 4 μ L, T4 DNA Ligase 1 μ L, ddH₂O补齐至25 μ L; 22 $^{\circ}$ C连接过夜。将构建的重组表达载体pET-32a(+)-tte-uvrD转化至*E.coli* BL21感受态细胞中,涂布有IPTG及X-Gal的含氨苄青霉素的LB琼脂平板,37 $^{\circ}$ C培养过夜,进行蓝白斑筛选,选取白色菌落,提取阳性转化子进行双酶切鉴定,将双酶切鉴定正确的阳性转化子送上海生工生物技术有限公司进行测序,测序引物采用上述Primer 1和Primer 2。碱基序列的比对在美国国立生物技术信息中心(NCBI)网站的BLAST软件上进行。

挑取前述经测序正确的单个阳性菌落接种到含50 μ g/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C, 200r/min培养至OD₆₀₀值达到0.5~0.6,加入终浓度为1mmol/L的IPTG于37 $^{\circ}$ C, 200r/min条件下培养3h。12000r/min离心1min收集菌体,保存于-80 $^{\circ}$ C。

1.5 粗酶液的制备

菌体以50mmol/L的Tris-HCl缓冲溶液(pH8.0)洗涤3次,按3mL缓冲液+1g菌体的比例配成菌悬液,置于0 $^{\circ}$ C的冰-水混合水浴中10min,用SCIENTZ-II D超声波细胞粉碎机(400W)超声波破碎处理99次,每次5s,间隔5s。4 $^{\circ}$ C下以12000r/min离心15min,收集上清液,添加饱和(NH₄)₂SO₄溶液使终浓度达80%,4 $^{\circ}$ C盐析过夜。经12000r/min离心30min得到粗酶沉淀,复溶于pH7.0的0.05mol/L磷酸缓冲液中,透析至无硫酸根,透析完的酶进行冷冻干燥12h制成粗酶粉,复溶

于20mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 200mmol/L KCl, 1mmol/L EDTA, 1mmol/L二硫苏糖醇, 50% (v/v) 甘油的缓冲液中, 即为粗酶液。粗酶液中蛋白的浓度采用Bradford检测法^[6], 即以BSA作为标准蛋白表示, 再将粗酶液浓度调整到160ng/ μ L。将粗酶液小量分装于-20℃贮存备用。

1.6 Tte-UvrD粗酶的初步应用

将刚提取的Tte-UvrD粗酶液应用到tHDA反应中, 观察其反应活性。选取副溶血性弧菌为目标检测对象, 以*tox R*为靶基因, 引物对及模版(PMD18-*tox R*)制备参考之前的研究^[7], 目的扩增段长度为79bp, 理论 T_m 值为77.8℃。tHDA反应体系(50 μ L)为: Bst Polymerase 0.8U, 10 \times Annealing buffer II (200mmol/L Tris, pH8.8 and 100mmol/L KCl) 5 μ L, MgSO₄(100mmol/L) 2 μ L, NaCl(500mmol/L) 4 μ L, dNTP(10mmol/L) 3.5 μ L, DNA template (3.50 $\times 10^7$ copies/mL) 2 μ L, 上游引物Primer 3 (10 μ mol/L) 1 μ L, 下游引物Primer 4 (10 μ mol/L) 1 μ L, Tte-UvrD粗酶液3.5 μ L, 20 \times EvaGreen 0.5 μ L, ddH₂O补齐至50 μ L。反应程序为: 63℃ 5s, 62℃ 55s, 进行40个循环; 熔解程序为: 95℃ 2min, 60℃ 2min, 60℃ 1s, 然后升温至95℃ (0.1℃采集一次荧光), 最后50℃冷却, 溶解速率为0.2℃/s。

1.7 粗酶液的稳定性实验

选取浓度分别为3.50 $\times 10^3$ copies/mL和3.50 $\times 10^5$ copies/mL的标准重组质粒PMD18-*tox R*为检测对象, 将粗酶液分别置于4℃和-20℃下, 每隔一段时间取出检测酶活, 以tHDA反应能检出PMD18-*tox R*的Ct值为酶活标准, 观察Tte-UvrD粗酶液酶活在不同贮存温度下随时间的变化。

1.8 粗酶液与纯酶的tHDA反应灵敏度比较

比较Tte-UvrD粗酶液与商品化Tte-UvrD纯酶的tHDA反应灵敏度。Tte-UvrD粗酶液选取于-20℃下保存两个月Tte-UvrD粗酶液, 以标准重组质粒PMD18-*tox R*为检测对象, 用双蒸水将初始拷贝数为3.50 $\times 10^7$ copies/mL的重组质粒按照1:10的比例梯度稀释, 稀释成3.50 $\times 10^1$ ~3.50 $\times 10^7$ copies/mL七个梯度, 取1 μ L各个稀释度作tHDA分析, 以反应能检测出的最低DNA量为该体系的检测灵敏度, 每个样本设置3个复孔及1个阴性对照孔。

2 结果与讨论

2.1 *tte-uvrD*基因的克隆

用PCR从古细菌*T. tengcongensis*的基因组中克隆了编码Tte-uvrD酶的读码框基因序列, 结果见图1。从电泳图上可见一条清晰的扩增条带约为2.2kbp, 大小与预期(2142bp)相符合。由于扩增所用引物的5'端添加了限制性酶切位点及一些保护碱基, 因而扩增得到的片断比目的基因稍大, 根据电泳结果初步判断扩增片断即为*tte-uvrD*基因。

2.2 阳性重组子质粒DNA双酶切鉴定

将该序列连接到载体pET-32a(+)上, 转化至*E.coli* BL21感受态细胞中, 经X-Gal筛选出来的阳性克隆菌后, 提取重组质粒pET-32a(+)-*tte-uvrD*, 经

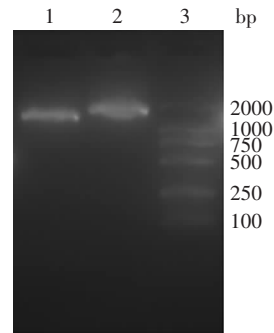


图1 *tte-uvrD* PCR扩增产物电泳图谱

Fig.1 Detection of *tte-uvrD* PCR products in agarose gels

注: 1, 2: PCR扩增产物; 3: DL 2000 DNA Marker。

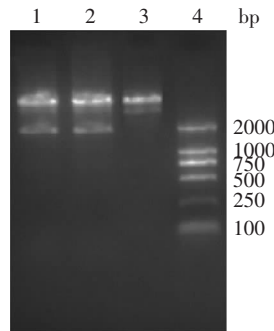


图2 重组表达载体pET-32a(+)-*tte-uvrD*的双酶切鉴定

Fig.2 Screening of recombinant plasmids with double digestion

注: 1, 2: 阳性重组子; 3: 质粒pET-32a(+); 4: DL 2000。

*Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 结果见图2。泳道1和2经双酶切的重组质粒释放约6.0kbp和约2.0kbp大小的片段, 分别对应pET-32a(+)和*tte-uvrD*的大小, 泳道3空质粒的阴性对照显示没有目的片段, 由此初步判定获得阳性重组子。将酶切鉴定正确的重组质粒进行双向测序, 测序结果表明, 其拥有一个2142bp的完整开放阅读框(ORF), 与GenBank中公布的*tte-uvrD*基因序列一致。BLAST同源序列比对结果显示两者同源性为100%, 表明*tte-uvrD*基因成功克隆pET-32a(+).

2.3 粗酶液的制备

将经测序正确的重组菌株转接到含氨基青霉素的LB发酵培养基中, 当菌体生长到对数期后, 加入IPTG诱导实现了高效分泌表达, 为该酶的后续定向研究及应用奠定了良好基础。本着尽量从上清液分离出酶, 又不使酶变性的原则, 将菌体超声破碎离心后, 用硫酸铵沉淀法得到粗酶沉淀, 用磷酸缓冲液透析至无硫酸根, 冻干制成粗酶粉再溶解于缓冲液中, 得到粗酶液。实验表明, 添加的(NH₄)₂SO₄终浓度为80%时, 可完全沉淀酶蛋白。由于Tte-uvrD的最适反应温度在63℃左右, 若采取45℃干燥法制备粗酶粉对酶活会造成一定的损失, 故采用冷冻干燥法以提高酶活得率。用Bradford检测法测得粗酶液中蛋白含量约为300ng/ μ L, 再将粗酶液浓度调整为160ng/ μ L。

2.4 粗酶液的初步应用

由图3可见, 将Tte-UvrD粗酶液应用于tHDA反应

中,能得到很好的扩增曲线、特异性的溶解曲线和熔点峰,荧光信号值增量,熔点峰尖呈“犀牛角”状,峰基底较窄,溶解曲线平滑呈陡直急剧下降。HRM曲线峰Tte-UvrD粗酶液能发挥较高的解旋活性,可很好地完成目的基因的扩增。

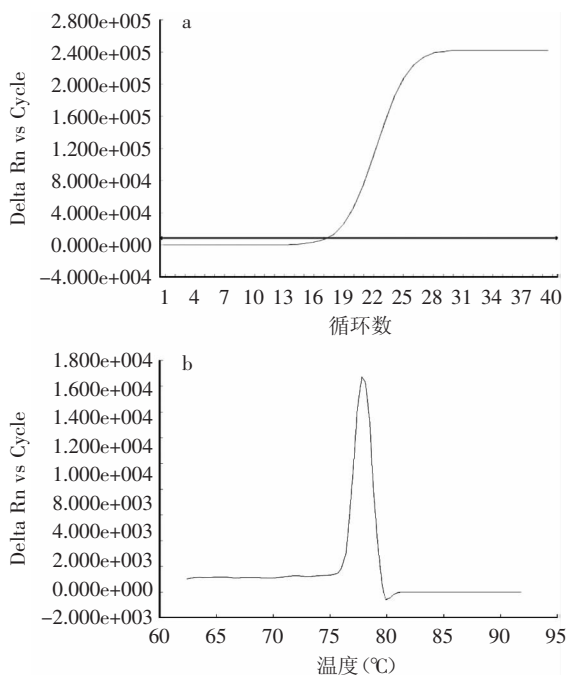


图3 Tte-UvrD粗酶液检测副溶血性弧菌的tHDA-HRM图
Fig.3 tHDA-HRM result on VP of Tte-UvrD crude enzyme
注:a:Tte-UvrD粗酶液检测副溶血性弧菌的荧光曲线扩增图;
b:Tte-UvrD粗酶液检测副溶血性弧菌的HRM图。

2.5 粗酶液的稳定性实验

由图4可知,Tte-UvrD粗酶液的稳定性实验结果表明,在4℃及-20℃下储存时,对于相同浓度的模版,测得的Ct值随着储存时间的延长呈现逐渐变大的趋势,表明Tte-UvrD粗酶液的酶活随着储存时间的延长酶活稍有降低。对 3.50×10^3 copies/mL和 3.50×10^5 copies/mL两个不同浓度的标准重组质粒PMD18-tox R的检测结果表明,4℃下储存时,Tte-UvrD粗酶液在第9d均已失活;而-20℃下储存时,粗酶液在第80d酶活还能保持稳定,第120d还有活性但活性

稍有降低,说明Tte-UvrD粗酶液的酶活在低温下更稳定。

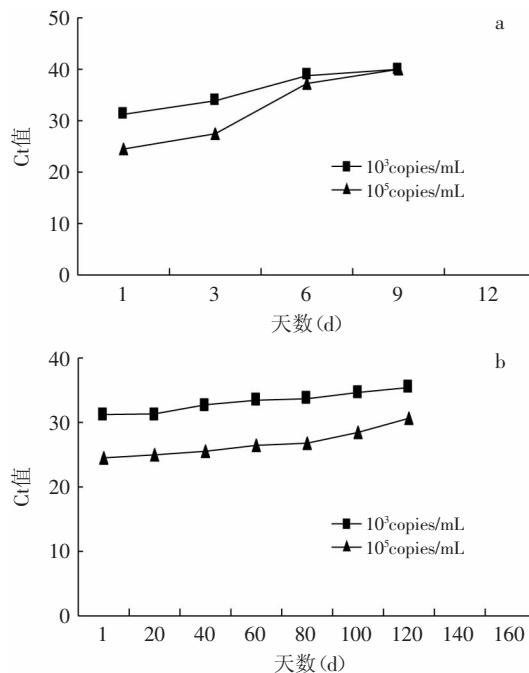


图4 不同储存温度下Tte-UvrD粗酶液活性随时间的变化
Fig.4 Activity of the Tte-UvrD crude enzyme in different temperature

注:a:4℃下Tte-UvrD粗酶液活性随时间的变化;b:-20℃下Tte-UvrD粗酶液活性随时间的变化。

2.6 粗酶液与商品化纯酶的反应灵敏度比较

由粗酶液的稳定性实验可知,-20℃下储存时,粗酶液在第80d酶活还能保持稳定,故选用-20℃下储存两个月的粗酶液与商品化纯酶进行tHDA反应活性比较。由表1可见,Tte-UvrD粗酶液于-20℃下保存两个月后,对于相同浓度的模版,其tHDA反应活性与商品化纯Tte-UvrD酶相比,虽然能检出的Ct值稍高于商品化纯酶,但能达到同等的灵敏度,具有很好的相似性,表明粗酶液中的Tte-UvrD酶在目标菌株的DNA模版的解旋过程中起到了重要作用。本实验选取的缓冲液组份为20mmol/L pH7.4 Tris-HCl, 200mmol/L KCl, 1mmol/L EDTA, 1mmol/L DTT, 50% (v/v)

表1 Tte-UvrD粗酶液和纯酶用tHDA-HRM法检测副溶血性弧菌灵敏度的比较

Table 1 Sensitivities for detection of VP in tHDA-HRM assay by Tte-UvrD crude enzyme and pure enzyme

稀释梯度	重组质粒浓度 (copies/mL)	Tte-UvrD粗酶液		Tte-UvrD纯酶	
		Ct值	T _m 值	Ct值	T _m 值
10 ⁻¹	3.50×10 ⁶	20.42±0.53	76.83±0.37	20.25±0.43	76.54±0.34
10 ⁻²	3.50×10 ⁵	22.81±0.31	76.25±0.12	22.15±0.21	77.65±0.57
10 ⁻³	3.50×10 ⁴	27.01±0.42	76.75±0.44	26.25±0.45	77.12±0.88
10 ⁻⁴	3.50×10 ³	30.33±0.28	75.34±0.57	29.45±0.35	75.66±0.72
10 ⁻⁵	3.50×10 ²	34.64±0.51	76.58±0.24	32.65±0.78	76.45±0.67
10 ⁻⁶	3.50×10 ¹	undet.		undet.	
10 ⁻⁷	3.50×10 ⁰	undet.		undet.	

注:undet.表明未检测出。

(下转第235页)

- [16] Gruwel M L H, Chatson B, Yin X S, *et al.* A magnetic resonance study of water uptake in whole barley kernels[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2001, 36(2):161-168.
- [17] Biswas A K, Sahoo J, Chatli M K. A simple UV-Vis spectrophotometric method for determination of β -carotene content in raw carrot, sweet potato and supplemented chicken meat nuggets[J]. LWT-Food Science and Technology, 2011, 44(8):1809-1813.
- [18] Koca N, Burdurlu H S, Karadeniz F. Kinetics of colour changes in dehydrated carrots[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 78

- (2):449-455.
- [19] Cui Z W, Xu S Y, Sun D W. Effect of microwave-vacuum drying on the carotenoids retention of carrot slices and chlorophyll retention of Chinese chive leaves[J]. Drying Technology, 2004, 22(3):563-575.
- [20] Baldermann S, Fleischmann M N P. Enzymatic carotenoid degradation and aroma formation in nectarines (*Prunus persica*) [J]. Food Research International, 2005, 38:833-836.
- [21] Kumar S, Ma B, Chung J T, *et al.* Folding and binding cascades: Dynamic landscapes and population shifts[J]. Protein Science, 2000, 9:10-19.

(上接第229页)

甘油,其中巯基保护剂DTT可阻止蛋白质中的半胱氨酸之间所形成的蛋白质分子内或分子间二硫键,保护酶分子上的还原性基团,其抗氧化作用可起到保证Tte-uvrD解旋酶酶活的作用。EDTA可螯合金属离子防止蛋白酶对酶的降解,从而稳定酶活。提取好的粗酶液小量分装可减少使用时的污染,也能防止反复冻融使酶活降低。

3 结论与讨论

随着人们对核酸等温扩增技术研究的不断深入,HDA技术已经成为一个新的研究热点。HDA技术依赖解旋酶解开DNA双链,相比其他核酸扩增技术而言,体系更简单,设计更简便,可恒温反应,大大降低成本,非常灵敏且技术特异性强,便于普及应用。而Tte-uvrD耐热解旋酶相比UvrD而言,可以在更高的温度范围内(60~65℃)维持高活性,且不需辅助蛋白和单链结合蛋白,为其在更苛刻的环境中发挥作用提供了条件。因此研发出简便的Tte-uvrD克隆表达纯化方法将为Tte-uvrD在等温核酸扩增的应用提供更多的发展空间。

在表达载体的构建中,本研究选用了高效表达的pET-32a(+)载体,pET-32a(+)是pET载体系统成员,该系统是目前在*E.coli*中克隆表达重组蛋白功能最强大的系统,克隆表达体系简便易操作,提取能保持酶活长达四个月的粗酶液,从而省略了繁琐的蛋白纯化过程,大大降低了提取成本,具有良好的开发应用潜力。由于常规的解旋酶活性测定方法繁琐且需要用到放射性物质^[8],造成一定的不安全因素,故本研究将Tte-uvrD粗酶液直接应用于tHDA反应体系中,用tHDA反应活性来反映Tte-uvrD粗酶液的解旋活性。结果表明本研究的纯化储存方法可获得具有较高解旋活性的Tte-UvrD粗酶液,还可有效减少分离及初步纯化过程中Tte-UvrD活性的降低,在-20℃下储存两个月后其tHDA反应活性与商品化纯Tte-UvrD酶相比能达到同等的灵敏度,表明粗酶液中的Tte-UvrD酶在目标菌株的DNA模版的解旋过程中起到了重要作用。

下一步的研究方向是,研发能达到类似或更高的

酶活的更简便的粗酶液提取或纯化改进方法,如可考虑采用真空浓缩、低温喷雾干燥等工艺来降低温度对酶活的影响以提高酶活得率;以及研发出能保持粗酶液的反应活性的延长粗酶液保存时间的酶贮存液。

参考文献

- [1] M Vincent, Xu Yan, Kong Huimin, *et al.* Helicase-dependent isothermal DNA amplification[J]. EMBO Rep, 2004, 5(8):795-800.
- [2] Goldmeyer James, Kong Huimin, Tang Wen, *et al.* Development of a novel one-tube isothermal reverse transcription thermophilic helicase-dependent amplification platform for rapid RNA detection[J]. Journal of Molecular Diagnostics, 2007, 9(5):639-644.
- [3] Pooria Gill, Mohsen Amini, Amir Ghaemi. Detection of *Helicobacter pylori* by enzyme-linked immunosorbent assay of thermophilic helicase-dependent isothermal DNA amplification [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2007, 59:243-249.
- [4] Pooria Gill, Amir-Houshang Alvandi, Hossein Abdul-Tehrani, *et al.* Colorimetric detection of *Helicobacter pylori* DNA using isothermal helicase-dependent amplification and gold nanoparticle probes[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2008, 62:119-124.
- [5] An Lixin, Tang Wen, A Tamara, *et al.* Characterization of a thermostable UvrD helicase and its participation in helicase-dependent amplification[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(32):28952-28958.
- [6] 周集体,关晓燕,曲媛媛. 苯酚降解菌株GXY-1分离鉴定、降解及其粗酶特性研究[J]. 大连理工大学学报, 2010, 50(3):340-345.
- [7] 覃倚莹,吴晖,肖性龙,等. *toxR*基因作为荧光定量PCR靶基因设计TaqMan探针快速检测副溶血弧菌[J]. 生物工程学报, 2008, 24(10):1837-1842.
- [8] 李昉,郝福英,黄力. 极端嗜热古菌——芝田硫化叶菌DNA解旋酶的分离纯化和性质研究[J]. 微生物学报, 2001(3):340-347.